

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

18/5/6  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009791152

WPI Acc No: 1994-071005/199409

XRAM Acc No: C94-031742

Prepn. of human serum albumin - by culturing cells transformed with a  
plasmid contg. AOX1 promoter and HSA gene

Patent Assignee: GREEN CROSS CORP (GREC )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6022784	A	19940201	JP 92203208	A	19920708	199409 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92203208 A 19920708

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6022784	A	11	C12P-021/00	

Abstract (Basic): JP 6022784 A

Human serum albumin (HSA) is prepared as follows, (1) a plasmid is constructed carrying compsns. of (a) AOXI promoter which contains DNA sequence (I) and (b) HSA; (2) the plasmid is introduced into a host for transformation; and (3) the obtd. transformant is cultured to produce HSA.

CCAGATTCTG GTGGAATAC TGCTGATAGC CTAACGTTCA TGATCATAAT CTAACGTTC  
TAACCCCTAC TTGGACTGGC AATATATAAA CAGGAGGAAA CTGCCAGTC GAAACCTTC  
TTCCTTATCA TCATTATTAG CTTACTTTCA TAATTGTGAC TGGTTCCAAT TGACAAGCTT  
TTGATTCTAA CGACTTTTAA CGACAATTTG AGAAGATCAA AAAACAATA ATTATTCGAA ACG  
(I)

USE/ADVANTAGE - By culturing a transformant e.g. Pichia yeast under controlling methanol concn. in the medium, HSA can be secreted into the medium high efficiently. Also highly purified HSA can be prepared by treating the cultured soln. with combination methods of ultrafiltration membrane, heat treatment, cationic ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, etc.

In an example, Pichia yeast GCP 104 and 101 were used. As promoter of HSA gene, Pichia yeast IFO-1013 derived AOXI promoter was used.

Dwg.0/3

Title Terms: PREPARATION; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; CULTURE; CELL; TRANSFORM;  
PLASMID; CONTAIN; PROMOTE; GENE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12P-021/00

International Patent Class (Additional): C12N-015/14; C12N-015/81;

C12P-021/00; C12R-001-84

File Segment: CPI

49

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-22784

(43) 公開日 平成6年(1994)2月1日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00		C 8214-4B		
// C 1 2 N 15/14				
15/81	Z N A			
(C 1 2 P 21/00		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平4-203208

(22) 出願日 平成4年(1992)7月8日

(71) 出願人 000137764

株式会社ミドリ十字

大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

(72) 発明者 鷺見 昭典

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内

(72) 発明者 大谷 渡

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内

(72) 発明者 大村 孝男

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 萩野 平 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト血清アルブミンの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 高レベルにHSAを産生する上で重要な働きを持つ新規なプロモーターを提供すること及びそれを得する方法を示すことであり、このプロモーターを担持したプラスミドを用いて形質転換体を取得し、HSAを産生する系を確立すること。

【構成】 (1) 配列番号1のDNA配列を有するAOX1プロモーターおよびヒト血清アルブミン遺伝子を担持してなるプラスミドを構築し、(2) そのプラスミドを宿主に導入して、形質転換させ、(3) 得られた形質転換体を培養して、ヒト血清アルブミンを産生させること、からなるヒト血清アルブミンの製造方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 配列番号1のDNA配列を有するA O X 1プロモーターおよびヒト血清アルブミン遺伝子を担持してなるプラスミドを構築し、(2) そのプラスミドを宿主に導入して、形質転換させ、(3) 得られた形質転換体を培養して、ヒト血清アルブミンを産生させること、からなるヒト血清アルブミンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なA O X 1プロモーターを担持するプラスミドを用いるヒト血清アルブミン(以下、HSAという)の製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 メタノール産性酵母はメタノールを炭素源およびエネルギー源として増殖する。その際、メタノール代謝経路において第1段階でアルコール酸化酵素(AOX、EC1. 1. 3. B)によりメタノールをホルムアルデヒドに酸化する。メタノール産性酵母の一種であるピキア酵母(*Pichia pastoris*)はゲノム中に二種のA O X遺伝子(A O X 1遺伝子、A O X 2遺伝子)を有する。

【0003】 この内A O X 1プロモーターとA O X 2プロモーターには活性に大きな差があり、通常ピキア酵母で発現されているA O XはほとんどA O X 1プロモーターによって転写されたものであることが示されている。

(*Molecular and Cellular Biology*, vol.9, 1316(1989))。A O Xはグルコース含有培地ではほとんど発現されないのに対し、メタノール含有培地では細胞中の可溶性蛋白質の30%を示すといわれている。A O Xをコードする2種類のA O X遺伝子のうち、A O X 1遺伝子の制御領域であるA O X 1プロモーターは強い活性を持ち、メタノール産性酵母の異種蛋白質の発現に用いられ、高い産生量を示した。しかしながら、A O X 2プロモーターは活性が弱く、異種蛋白質の発現には適当ではなかった。メタノール産性酵母の異種蛋白質の発現系は大量に産物が得られるために、その発現系に強力なプロモーターが求められていた。

【0004】 最近、そのA O X遺伝子の調節領域を用いて異種蛋白質を産生する方法が研究されている(*Yeast*, 5, 167-177(1989)、特開平1-128790号公報、同2-104290号公報、ヨーロッパ公開公報347928等)。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、高レベルにHSAを産生する上で重要な働きを持つ新規なプ

2

ロモーターを提供すること及びそれを取得する方法を示すことである。このプロモーターを担持したプラスミドを用いて形質転換体を取得し、HSAを産生する系を確立することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、(1) 配列番号1のDNA配列を有するA O X 1プロモーターおよびヒト血清アルブミン遺伝子を担持してなるプラスミドを構築し、(2) そのプラスミドを宿主に導入して、形質転換させ、(3) 得られた形質転換体を培養して、ヒト血清アルブミンを産生させること、からなるヒト血清アルブミンの製造方法である。

## 【0007】 (a) A O X 1プロモーター

本発明のプロモーターを取得するための原料細胞としては、ピキア酵母 IFO-1013等が例示される。製法としては、原料細胞から公知の方法(例えば、Maniatis T. 等、*Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory NY (1982) 等)に準じて染色体DNAを抽出し、これを適当な制限酵素(*EcoRI* 等)によって部分消化し、適当なファージベクター(例えば、 $\lambda$ gt10、EMBL3)に導入した後(図1にA O X遺伝子を $\lambda$ gt10に組み込んだ制限酵素地図を示す。)、適当な宿主(例えば、大腸菌LE392株やWL95株など)を形質転換してヒトジェノミクライブラリーを得る。合成プローブによるスクリーニングによって陽性クローンを得、目的とするファージDNAを回収する。ファージDNAを適当な制限酵素(*BamHI*、*HindIII* 等)によって消化し、適当なプラスミドベクター(例えば、pUC19など)に導入して宿主(例えば大腸菌JM109株)を形質転換し、目的とするクローンを得る。

【0008】 DNAの塩基配列は公知の方法(例えば、キロシークエンス法、マキシム・ギルバート法、ダイデオキシ法)によって行われる。本発明のプロモーターを含む塩基配列は、A O X 1遺伝子転写開始点の5'側上流域に存在し、約240bpを有している。その塩基配列はキロシークエンス法によれば配列番号1に示す通りである。

【0009】 尚、特開昭61-173781号公報に開示されたA O X 1プロモーターとはDNA配列が異なる。表1にその比較を示す。

## 【0010】

## 【表1】

表1

配列番号1のDNA番号	3-4	77	94	100	107	111 112	120	123 124	167	187	207
本発明	A&G	T	G	A	A	G A	C	C C	T	C	T
特開昭81-173781号公報	AAG	A	A	G	T	T T	T	T T	C	T	C

## 【0011】(b) プラスミド

本発明のプラスミドは(a)のAOX1プロモーターを担持してなる。また、シグナル配列、HSA遺伝子、ターミネーター、相同領域、マーカー遺伝子、宿主中で複製可能な自律性複製配列等を担持していてもよい。HSA遺伝子は公知のものであれば特に制限されない。同一または相同でもよく、具体的には特開昭58-56684号、同62-29985号の各公報等に関連されている。

【0012】シグナル遺伝子は、酵母インベルターゼ、 $\alpha$ -ファクター遺伝子のような酵母由来のもの、HSAのシグナル配列またはその誘導体(特開平2-167095号)、人工的に創案したシグナル配列(特開平1-240191号)等を用いることができる。ターミネーターとしてはAOX1ターミネーター等を用いることができる。

【0013】相同領域はHIS4、URA3、LEU2、ARG4等が例示される。マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子や栄養要求性相補遺伝子等が用いられる。抗生物質としてはシクロヘキシミド、G-418、クロラムフェニコール、プレオマイシン、ハイグロマイシン等が例示される。栄養要求性相補遺伝子としては、HIS4、URA3、LEU2、ARG4等が挙げられる。

【0014】転写ユニットは5'側から3'側に向かって、AOX1プロモーター、シグナルペプチド遺伝子、HSA遺伝子、ターミネーターの順に配置される。本発明のプラスミドは通常の遺伝子工学技術を用いて調製することができる。

## (c) 形質転換体

本発明の形質転換体は(b)のプラスミドを導入してなる。

【0015】本発明の宿主は酵母が好ましく、より好ましくはピキア酵母(*Pichia pastoris*)である。具体的にはGTS115(NRRL寄託番号Y-15851)等が例示される。宿主細胞(酵母)の形質転換は公知の方法、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、プロトプラストポリエチレン融合法、エレクトロポレーション法などが使用でき、必要な形質転換体を選択する。

【0016】プラスミドの宿主細胞中での存在の様式

は、染色体中に挿入されて、あるいは置換されて組み込まれる。または、プラスミド状態で存在していてもよい。宿主に導入される外来遺伝子のコピー数は1コピーでも複数コピーでもよい。また、他のプロモーターでHSAを発現させるプラスミドと同じ菌株内に存在させても構わない。

## 【0017】(d) HSAの製造方法

(c)で得られた形質転換株は、宿主細胞の自体公知の培地で培養する。培地としては0.01~5%メタノールを含有したYNB液体培地[0.7% Yeast Nitrogen Base(Difco社)]、および0.01~5%メタノールを含有したYP培地[1%イーストエキストラクト(Difco社)、2%ポリペプトン(大五栄発社)]などが例示される。

【0018】培養は、通常15~43℃(好適には30℃程度)で20~360時間程度行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。培養後、培養上清から、自体公知の方法、例えば膜濾過、イオン交換法、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル濾過分画法などによりHSAを精製する。

## 【0019】

【実施例】本発明をより詳細に説明するために実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。なお、本発明において多くの技法、反応および分析方法は当業界においてよく知られている。特に断らない限り、全ての酵素は商業的供給源、例えば、宝酒造等から入手することができる。

【0020】酵素反応のための緩衝液及び反応条件は特に断らない限り各酵素の製造元の推奨に従って使用した。プラスミドを用いた大腸菌の形質転換法、ブランクハイブリダイゼーション法、及び電気泳動法は「モレキュラークローニング」コールドスプリングハーバーラボラトリー[「Molecular Cloning」Cold Spring Harbor Laboratory(1982)]に記載されている方法により行った。

【0021】実施例1-1 ピキア酵母AOX1遺伝子のクローニングとそのプロモーターを用いたHSAの生産

使用した酵母株

5

ピキア酵母IFO-0948と同IFO-1013とは、(財)発酵研究所より入手した。ピキア酵母ATCC-2604とピキア酵母ATCC-28485とはATCCより入手した。ピキア酵母GTS115(his4)はピキア酵母における形質転換用宿主として使用した。

#### 【0022】AOX1遺伝子のクローニング

Rothstein等の方法(Rothstein, R. In "DNA cloning", 38, 675 (1974))に従って、ピキア酵母IFO-1013より染色体DNAを抽出した。その他のDNAの取り扱い、一般的な方法(例えば、Maniatis T. 等、Molecular cloning, a laboratory manual)に従った。AOX1遺伝子のスクリーニングには、配列番号2及び3の2種類のオリゴヌクレオチドプローブを使用した。

#### 【0023】AOX1遺伝子欠損株の作製

ピキア酵母IFO-1013よりクローニングしたAOX1遺伝子を用いて、ピキア酵母GTS115内在性のAOX1遺伝子を破壊した。IFO-1013由来AOX1遺伝子を制限酵素PstIとXbaIとで消化した後、約3kbのDNA断片をプラスミドpUC19にサブクローニングした。さらに、このプラスミドのAOX1遺伝子上に存在するSalI部位に3kbのパン酵母由来SUC2遺伝子を挿入した。得られたプラスミドを用いてピキア酵母GTS115を形質転換した。形質転換体の選択はシュークロース資化能の獲得により行った。

#### 【0024】結果

(財)発酵研究所及びATCCより入手した各ピキア酵母、IFO-0948、IFO-1013、ATCC-2604、ATCC-28485の4株について、そのメタノール資化能をメタノールを単一炭素源とする最小培地における増殖度を指標に比較した。これら4株の増殖はグルコースやエタノールを炭素源とする培地では差がなかったが、メタノール含有培地ではピキア酵母IFO-1013が他の3株より増殖が速く、かつ最終菌体濃度も最も高かった。この結果よりピキア酵母IFO-1013はメタノール資化能が高くアルコールオキシダーゼ発現量が多い株であると判断した。

【0025】ピキア酵母IFO-1013よりAOX1遺伝子をクローニングするため、この株より染色体DNAを抽出した。抽出した染色体DNAを制限酵素EcoRIで消化後ファージベクターλgt10に導入し、ピキア酵母の染色体DNAライブラリーを作製した。ライブラリーの約 $5 \times 10^5$  クローンについてブランクハイブリダイゼーションによるAOX1遺伝子のスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションプローブとしては、既に報告されているピキア酵母のアルコールオキシダーゼのアミノ酸配列を基に、そのN末端領域とC末端

6

領域とにそれぞれ相補する2種類の合成オリゴヌクレオチドを使用した(配列番号2及び3)。ハイブリダイゼーションの結果、4個のポジティブクローンが得られた。これら4クローンのうち最も大きなDNAインサート(5.7kb)を有するクローンλMR101についてより詳細に検討した。上述のハイブリダイゼーションプローブを用いたサザンブロット解析とDNA塩基配列の決定より、クローンλMR101が完全長のAOX1遺伝子を含むことが明らかとなった。このAOX1遺伝子の塩基配列は配列番号1の3'末端に連結されていた。IFO-1013株のAOX1遺伝子のDNA塩基配列を配列番号2として示す。このAOX1遺伝子は1989bpのコード領域を有し、5'-非コード領域内ATG上流154~159bpの位置(配列番号1の85~90番目の塩基)にはTATA(TATAAA)ボックス配列が存在した。

【0026】ピキア酵母でHSAの分泌発現を試みるために、AOX1遺伝子のプロモーター領域を含む1.9kbのEcoRI-AseI断片をピキア酵母形質転換用プラスミド上にサブクローニングし、さらにHSAcDNAをAOX1遺伝子のプロモーターの下流に挿入した。このHSA発現プラスミドを用いてピキア酵母GTS115とその内在性AOX1遺伝子の欠損株であるピキア酵母GTS120とを形質転換した。形質転換体の選択は、HSA発現用プラスミド内に含まれるHIS4遺伝子の導入によるヒスチジン要求性の消失により行った。得られたピキア酵母形質転換体各10株をメタノール含有培地を用いて30℃で2日間培養し、その培養上清をSDSゲル電気泳動分析と抗HSA抗体を用いたウェスタンブロット分析にかけた。その結果、いずれの株においても天然型HSAと同じ分子量である67kDaの大きさのところにメインバンドが観察され、これら形質転換体であるHSAが発現し、培地中に分泌されていることが示された。一方、グルコースを含む培地で培養した場合、いずれの形質転換体においてもHSAは全く検出されず、IFO-1013株由来AOX1プロモーター活性はグルコース存在下では抑制されることが判明した。ピキア酵母GTS115とGTS120との形質転換体よりHSAの生産量が最も多いクローンをそれぞれ選び、これをピキア酵母GCP101及びGCP104と命名した。両株のHSAの生産量はフラスコ培養ではともに80mg/Lであり、差は認められなかった。

【0027】実施例1-2(ピキア酵母を用いたHSAの高密度菌体培養)

#### 使用菌株

ピキア酵母GCP104およびピキア酵母GCP101を使用した。両者ともHSA遺伝子のプロモーターとしてピキア酵母IFO-1013由来のAOX1プロモーターを使用した。

【0028】培地組成

FM-21 (Sreekrishna, K., et al. \*3に示した。  
 l. : Biochemistry, 28, 4117 (1989) [0029]  
 989) ) 培地を使用した。本培地の組成を表2及び表\* [表2]

バッチ培養用FM-21培地組成

組成	配合量
グリセロール	50.0 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	14.0 mL
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.6 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	7.8 g
KOH	2.6 g
ビオチン貯蔵溶液 (*1)	1.6 mL
YTM貯蔵溶液 (*2)	4.4 mL
H <sub>2</sub> O	1.0 L
pH 5.6	

\*1 : 0.2 g/L

\*2 : YTM貯蔵溶液組成

組成	配合量
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	65.0 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	6.0 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20.0 g
MnSO <sub>4</sub> · nH <sub>2</sub> O	3.0 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0 mL
H <sub>2</sub> O	1.0 L

[0030]

※ ※ [表3]

FM-21フィード培地組成

組成	配合量
メタノール	1.0 L
YTM貯蔵溶液 (*2)	2.0 mL

[0031] 培養方法

凍結菌株を2%グルコースを炭素源とするYNB培地  
 (Difco社製) 100mLに植菌後、30℃にて2  
 4時間培養したものをFM-21培地1L (リットル)

を含む3L容のジャーフェーマンター (バイオマスター  
 D型、エイブル社製) に植菌し、通気攪拌培養を行っ  
 た。培養温度は30℃、通気量を2L/分に設定し、攪  
 拌速度の上限は1500rpmとした。培養中のpHは

5.85を保持するようアンモニア水にて定値制御した。消泡は消泡剤(Adecanol、旭電化工業社製)を回分培養開始時に0.30mL/L-broth添加し、その後は必要に応じて少量添加することで実施した。HSAの産生を誘導するため、FM-21培地中のグリセロールが消費された時点よりメタノールを主成分とするフィード培地の添加を開始した。フィード培地の添加量は培地中のメタノール濃度が1%を超えない範囲に調節した。

#### 【0032】菌体濃度の測定

任意の培養時間で培養液をサンプリングし、蒸留水で適当に希釈したのち、分光光度計(UV240、島津社製)を用いて540nmにおける吸光度を測定した。吸光度から乾燥菌体重量への変換は予め求めておいた校正曲線により実施した。

#### 【0033】分泌されたHSAの定量

任意の培養時間で培養液をサンプリングし、15000rpm、5分間遠心後、得られた上清を用いてマンシーニ法(LCパルチゲン・アルブミン、ベーリングベルケ社製)により測定した。

培地中のメタノール濃度の定量

任意の培養時間で培養液をサンプリングし、15000rpm、5分間遠心後、得られた上清をウルトラフリーC3HVにより清澄濾過後HPLCによる定量分析を実施した。

#### 【0034】

カラム: WATERS Sugar pak-Ca

カラム温度: 80℃

移動相: 0.02% NaN<sub>3</sub>

検出: 示差屈折計

結果

FM-21培地を使用したピキア酵母GCP104の培養結果を図2に示した。○は、該培地におけるメタノール濃度(v/v)を示し、□は、該培地中に分泌されたHSA濃度であって、マンシーニ法により求めた値である。●(DCW)は、培地1L当たりの乾燥細胞重量を示す。

【0035】この時、HSA産生量は約1.4g/Lであった。同じ条件にてピキア酵母GCP101を培養した結果を図3に示した。本菌株は、メタノール消費速度が高いため、培地中へのメタノールの蓄積はほとんど認められなかった。また、菌体増殖も極めて良好であり、DCWが110g/L以上の高密度培養が可能であった。しかし、HSA産生量は約1.2g/Lにとどまった。GCP101の場合、GCP104に比べて菌体濃度は1.5倍に上昇しているにもかかわらず、HSA産生量は低迷した。

【0036】そこで、GCP101を使用し、グリセロールが消費された以降の酸素供給速度を低下させることで、培地中のメタノール濃度を1%程度に保持しながら

培養した。結果を図4に示した。GCP101を使用しているにもかかわらず、菌体量は、DCWで75g/L程度までしか増加しなかったが、HSA産生量は1.4g/Lに上昇することが観察された。

#### 【0037】実施例1-3 粗精製法のスケールアップ検討

粗精製法に用いる培養液の規模は100Lに相当する量とした。検討を重ねた結果、以下に示した粗精製工程が最適であると考えられた。

#### 10 圧搾工程

圧搾工程に関しては培養液の圧入、圧搾時の圧力に注意を払って培養上清をできるだけ多く回収し、なおかつ透明性の良い濾過液を効率良く得られる条件を検討した。

#### 【0038】膜処理工程-1

0.22μmのフィルターを用いた検討を行った。さらにこの工程において同時に分画分子量が30万の限外濾過膜を用いた検討を行った。濾過方法はタンジェンシャルフロー法を用い、処理容量の増加に応じて膜面積は平膜を積み重ねることで1.84m<sup>2</sup>とした。濃縮は分画分子量が1万の限外濾過膜を用いて膜面積2.3m<sup>2</sup>のタンジェンシャルフロー法で行った。

20

#### 【0039】加熱処理工程

培養上清中に60℃、3時間の加熱処理を行った。加熱処理時のボリュームは培養上清の約10~15倍濃縮した値に相当する約5Lとした。

#### 膜処理工程-2

膜処理の条件は膜処理工程-1と同じとした。即ち、分画分子量30万の限外濾過膜を用いて高分子物質を除去し、ダイヤフィルトレーションを行ってHSAを回収した後、通過したHSAを分画分子量1万の限外濾過膜を用いて濃縮を行った。用いた限外濾過膜の膜面積も膜処理工程-1と同じとした。

30

#### 【0040】陽イオン交換クロマトグラフィー

HSAをゲルに吸着させ、洗浄して不純物を除去した後、HSAを溶出する手法を用いた。そのため、HSAの等電点以下のかかなり低いpH領域(pH4~4.6)で処理する必要がある。Sタイプ(強酸系でイオン交換基がスルフォ基であるもの)の交換体を用いて陽イオンクロマトグラフィーの検討を行った。交換体のベッドボリュームは5Lとした。

#### 【0041】結果

#### 圧搾工程

圧入は経時的に圧力を上昇させて最終的に2.0Kg/m<sup>2</sup>まで圧力を上昇させた。圧入後の圧搾は経時的に圧力を上昇させて、最終的に5.0Kg/m<sup>2</sup>の圧力で行うことで良好な結果がえられた。圧搾された酵母のフィルターケーキは含水率も低く、濾布からの剥がれも良好であった。この条件下での圧搾により培養液の約60~65%が濾過液として回収できた。圧入に要する時間は約1時間であり、圧搾に関しても約1~2時間程度が良

50



かった。

#### 【0042】膜処理工程-1

HPLC分析の結果から、分画分子量が30万の限外濾過膜で高分子物質が大部分除去されており、また、分画分子量が1万の限外濾過膜を用いて濃縮する過程で、大部分の低分子物質も除去されていることが判った。

#### 加熱処理工程

安定化剤（HSAの8倍量の長鎖脂肪酸、例えば、オレイン酸あるいはパルミチン酸等）を添加すること、および設定温度（60℃）への到達に要する時間をできるだけ短時間とすることで（30分以内）、HSAの回収率10  
 に関しては良好な結果が得られた。また、プロテアーゼも完全に不活性化されることが確認され、HPLC分析の結果を見ても以降の工程においてHSAの分解物が増加する傾向は認められず、HSAは加熱処理に対して安定であった。

#### 【0043】膜処理工程-2

再度分画分子量が30万の限外濾過膜を用いた高分子物質の除去を行った。この工程で高分子物質は大部分が除去された。ダイヤフィルトレーションを行った後の溶液20

の濃縮は、分画分子量が1万の限外濾過膜を用いて行ったが、最終的なHSA回収率もほぼ100%と良好であった。

#### 【0044】陽イオン交換クロマトグラフィー

培養終了後の培養上清の分析結果から、培養上清中には酵母が産生、分泌したと思われる糖質が含まれていることが、判明した。酵母が産生する糖質の量は、産生されるHSAの量と同等かそれ以上であることも判明した。この糖質の分析を行ったところ、大部分は多糖の形で存在しており、さらに、多糖の大部分はマンナンまたはホスホマンナンであろうと推定される中性糖及び酸性糖であった。これらの多糖を分離する目的でHSAの等電点以下（pH4.0～4.6）でクロマト処理を行った。即ち、陽イオン交換体にHSAを吸着させて、酸性糖および中性糖は陽イオン交換体に吸着しないことを利用して多糖の洗浄除去を行った。

【0045】以上の各工程の収率等の精製結果の一例を表4に示した。

#### 【0046】

【表4】

## 精製の結果

工程	条件	回収率	純度 <sup>*2</sup>	糖量 <sup>*3</sup>
圧搾工程	2Kg/m <sup>3</sup> まで圧入 5Kg/m <sup>2</sup> で圧搾	60～65% <sup>*1</sup>	～10%	1.2
膜処理工程-1	分画分子量30万の限外濾過 膜で高分子物質を除去。 分画分子量1 万の限外濾過 膜でHSAを濃縮。	～100%	～65%	0.7
熱処理工程	60℃、3 時間（オレイン酸 ナトリウムの添加）	90～95%	～50%	0.7
膜処理工程-2	分画分子量30万の限外濾過 膜で高分子物質を除去。 分画分子量1 万の限外濾過 膜でHSAを濃縮。	～100%	～75%	0.7
陽イオン交換 クロマトグラ フィー	吸着pH 4.5 溶出pH 5.3	75～83%	～85%	0.008

<sup>\*1</sup>:培養上清からの回収率

<sup>\*2</sup>:HPLCで検出されたHSAモノマーの%

<sup>\*3</sup>:HSAと糖との重量比率

【0047】実施例1-4 高度精製法の検討  
1-3で検討した粗精製が終了した段階では、HPLC分析からHSA以外の酵母由来不純物はかなり除去されていることが判るが、HSAのダイマーおよび分解物が認められる。これらの中で、特にHSAの分解物を除去する目的で疎水結合クロマトグラフィー（フェニルセルロファインゲル使用）を検討した。

【0048】HSAモノマーおよび分解物を一度ゲルに吸着させて、溶出条件の差で分解物を除去する吸着法と、HSAの分解物のみをゲルに吸着させてHSAのモノマーと分離させる方法（素通し法）を検討した。疎水クロマトグラフィーの結果を表5に示した。条件は以下による。

50 素通し法(Pass-Through Method)

ゲルに通過させる試料をNaClで26mS(pHは6.7)に調整し、ゲルを緩衝液(0.15M NaCl, 0.05M 磷酸塩 pH6.3)で平衡化した。ゲルに通過させた試料を保管した。

【0049】吸着法

硫酸アンモニウムを添加し最終濃度を1.8M(pHを6.7に調整)とした。ゲルを緩衝液(1.8M 硫酸アンモニウム, \*

疎水クロマトグラフィーの結果

\*0.15M NaCl, 0.05M 磷酸塩 pH6.3)で平衡化した。試料をゲルにかけて吸着させた。洗浄後、溶出液(0.15M NaCl, 0.05M 磷酸塩 pH6.3)でHSAモノマーを溶出した。

【0050】

【表5】

	素通し法*	吸着法**
回収率	90～95%	70～75%
容量	～30mg/mLゲル	～30mg/mLゲル
分解物の除去	良好	良好
操作性	容易	難しい
不純物の除去	悪い	良好

【0051】実施例1-5 不純物の高感度測定系の検討

上記の方法で精製した高度精製HSA溶液(素通し法による疎水クロマトグラフィー終了後のもの)中に存在する酵母由来成分を検出するために、EIA法による高感度測定法を検討した。HSA非産生酵母上清濃縮液をフロイントのコンプリートアジュバンドと共にウサギに免疫し、得られた抗血清を用いたEIA法を行った。測定は競合反応によるインヒビション法で行った。

【0052】結果

酵母成分の検出用に用いた標準品の組成は、蛋白質含量として176μg/mL(ローリー法)、多糖含量として68mg/mL(フェノール-硫酸法)であった。これらの数値を基に酵母由来成分のEIA法による測定

用の標準線を作成した(図5)。その結果、不純物の検出限界として蛋白質濃度で215pg/mL、糖濃度で83ng/mLの高感度な測定系が開発できた。この測定系を用いて、精製HSA溶液(疎水クロマトグラフィー処理液)中の酵母由来成分の含量を測定したところ、25%濃度まで濃縮した精製HSA中に検出される酵母由来成分の含量は、蛋白質濃度換算で49.5ng/mL(純度99.99998%)、糖濃度換算で19.1μg/mL(純度99.992%)であった(表6)。コントロールとして、25%血漿由来アルブミン溶液について測定したところ、酵母由来成分は検出されなかった。

【0053】

【表6】

## 精製HSAにおける酵母由来成分の含量

試料	HSA含量 (mg/mL)	酵母由来成分の含量	
		蛋白質	糖
精製HSA**	250	49.52ng/mL 純度(99.99998%)	19.12 $\mu$ g/mL 純度(99.992%)
血漿HSA	250	<0.7ng/mL*	<0.3 $\mu$ g/mL*

\* : これらの値はEIA の検出限界である。

\*\* : 疎水クロマトグラフィー後の試料

## 【0054】

【発明の効果】本発明は、AOX1プロモーターの下流にヒト血清アルブミン遺伝子を担持してなるプラスミドを例えばビキア酵母に導入して、形質転換させると共にこれを培地におけるメタノール濃度を制御して培養することにより、非常に高効率にヒト血清アルブミンを培地中に分泌させることができ、この培養液を限外濾過膜、加熱処理、陽イオン交換クロマトグラフィー及び疎水クロマトグラフィー等を組み合わせることで高度に精製されたHSAを提供することができる。

## 【0055】

## 配列

```

CCAGATTCTG GTGGAATAC TGCTGATAGC CTAACGTTCA TGATCATAAT CTAAGTGTTC 60
TAACCCCTAC TTGACTGGC AATATATAAA CAGGAGGAAA CTGCCAGTC GAAAACCTTC 120
TTCCYTATCA TCATTATTAG CTTACTTTCA TAATTGTGAC TGGTTCCAAT TGACAAGCTT 180
TTGATTCTAA CGACTTTTAA CGACAATTG AGAAGATCAA AAAACAATA ATTATTGAA 240
ACG 243

```

配列番号 : 2

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

## 配列

```

ATGCTTCCAA GATTCTGGT GGAATACTGC TGATAGCCTA ACGTTCATGA 50

```

配列番号 : 3

配列の長さ : 46

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

## 配列

```

TCAAGAGGAT GTCAGATGC CATTGCCTG AGAGATGCAG GCTTCA 46

```

## \* 【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 243

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 プラスミドDNA

配列の特徴

30 特徴を表す記号 : promoter

特徴を決定した方法 : E

\*

※トポロジー : 直鎖状

40 配列の種類 : 他の核酸 プローブDNA

配列の特徴

※ 特徴を決定した方法 : E

配列番号: 4

配列の長さ: 2260

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法: E

## 配列

ATG GCT ATC CCT GAA GAG TTT GAT ATC CTT GTT TTA GGT GGT GGA	45
TCC AGT GGA TCC TGT ATT GCC GGA AGA TTG GCC AAC TTG GAC CAC	90
TCC TTG AAA GTT GGT CTT ATC GAG GCA GGT GAG AAC AAC CTC AAC	135
AAC CCA TGG GTT TAC CTT CCA GGT ATT TAC CCA AGA AAC ATG AAG	180
TTG GAC TCC AAG ACT GCA TCC TTC TAC ACT TCT AAC CCT TCT CCT	225
CAC TTG AAC GGT AGA AGA GCT ATT GTT CCA TGT GCT AAC GTC TTG	270
GGT GGT GGT TCT TCC ATT AAC TTC ATG ATG TAG ACC AGA GGT TCT	315
GCT TCT GAT TAT GAC GAC TTC CAA GCC GAG GGC TGG AAA ACC AAG	360
GAC TTG CTT CCA TTG ATG AAA AAG ACC GAG ACC TAC CAA AGA GCT	405
TGC AAC AAC CCT GAC ATT CAC GGG TTC GAA GGT CCA ATC AAG GTT	450
TCT TTG GGT AAC TAC ACC TAC CCA GTT TGC CAG GAC TTC TTG AGA	495
GCT TCT GAA TCC CAA GGT ATT CCA TAC GTT GAC GAC TTG GAA GAC	540
TTG GTT ACT GCT CAC GGT GCT GAA CAC TGG CTG AAA TGG ATC AAC	585
AGA GAC ACT GGT CGT CGT TCC GAC TCC GCT CAT GCA TTT GTC CAC	630
TCT ACT ATG AGA AAC CAC GAC AAC TTG TAC TTG ATT TGT AAC ACA	675
AAG GTT GAC AAG ATA ATT GTC GAA GAC GGA AGA GCT GCT GCT GTT	720
AGA ACT GTT CCA AGC AAG CCT TTG AAC CCA AAG AAG CCA AGT CAC	765
AAG ATC TAC CGT GCT AGA AAG CAA ATC GTT TTG TCT TGT GGT ACC	810
ATC TCA TCT CCT TTG GTT CTG CAA AGA TCC GGT TTC GGT GAC CCA	855
ATC AAG TTG AGA GCC GCT GGT GTT AAG CCT TTG GTC AAC TTG CCT	900
GGT GTC GGA AGA AAC TTC CAA GAC CAC TAC TGT TTC TTC AGT CCT	945
TAC AGA ATC AAG CCT CAG TAC GAA TCT TTC GAT GAC TTC GTG CGT	990
GGT GAT GCT GAG ATC CAA AAG AGA CTT TTC GAC CAA TGG TAC GCC	1035
AAT GGT ACT GGT CCT CTT GCC ACT AAC GGT ATC GAA GCC GGT GTC	1080
AAG ATT AGA CCA ACA CCA GAG GAA CTG TCT CAA ATG GAC GAA TCT	1125
TTC CAA GAG GGT TAC AGA GAA TAC TTT GAG GAC AAG CCA GAC AAG	1170
CCA GTT ATG CAC TAC TCC ATT ATT GCT GGT TTC TTC GGT GAC CAC	1215
ACC AAG ATT CCT CCT GGA AAG TAC ATG ACC ATG TTC CAC TTT TTG	1260
GAA TAC CCA TTC TCC AGA GGT TCC ATT CAC ATT ACC TCT CCA GAT	1305
CCA TAC GCA GCT CCA GAC TTC GAC CCA GGT TTC ATG AAC GAT GAA	1350
AGA GAC ATG GCT CCT CTG GTC TGG GCC TAC AAG AAG TCT AGA GAG	1395
ACA GCT AGA AGA ATG GAC CAC TTT GCC GGT GAG GTT ACT TCT CAC	1440
CAC CCA TTG TTC CCA TAC TCA TCC GAG GCC AGA GCT TTG GAG ATG	1485
GAT TTG GAG ACC TCC AAT GCC TAC GGT GGA CCT TTG AAC TTG TCT	1530
GCT GGT CTT GCC CAC GGT TCT TGG ACT CAA CCT TTG AAG AAG CCA	1575
ACT GCA AAG AAC GAA GGC CAT GTT ACC TCC AAC CAA GTC GAG CTT	1620
CAT CCA GAC ATC GAG TAC GAC GAG GAG GAC GAC AAG GCC ATT GAA	1665
AAC TAC ATC CGT GAG CAC ACT GAG ACC ACA TGG CAC TGT CTG GGA	1710
ACC TGT TCC ATG GGT CCA AGA GAG GGT TCC AAC ATC GTC AAA TGG	1755
GGT GGT GTT TTG GAC CAC AGA TCC AAC GTT TAC GGA GTC AAG GGC	1800
CTG AAG GTT GGT GAC TTG TCT GTC TGT CCA GAC AAT GTT GGT TGT	1845
AAC ACC TAC ACC ACC GCT CTT TTG ATC GGT AGG AAG ACT GCC ACT	1890
TTG GTT GGA GAA GAC TTA GGA TAC ACC GGT GAA GCC TTA GAC ATG	1935
ACT GTT CCT CAG TTC AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG ACC GGT CTT	1980
GCT AGA TTC TAACCAATGA GGATGTCAAT GACATTGTGTC TGAGAGATAGC	2029

21

22

AGGCTTCATA TTTTGTATAA TTTTITATTT GTAACCTATA TAGTATAGGA GATTTTTTTT 2089  
 GTCAITTTGT TTCTTCTGCT ACGAGCTTGC TTCTGATCAA CCTATCTCTA AGCTGATGCA 2149  
 TATCTTGTGG TAGGGGTTTG GGAAAATCGT TTGAGTTGGA TGTTTACTT GGTACATGCC 2209  
 ACCTTCTTCG AAGTACAGAA GATTAAGTGA GACACTCATT TGTGCAAGCT T 2260

【図面の簡単な説明】

【図1】 AOX遺伝子をλgt10に組み込んだ制限酵素地図を示す。

【図2】 FM-21培地を使用したビキア酵母GCP104の培養結果を示す。

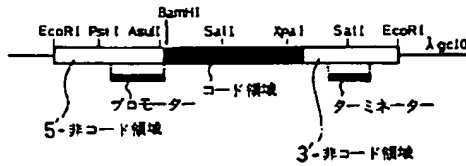
【図3】 FM-21培地を使用したビキア酵母GCP110

01の培養結果を示す。

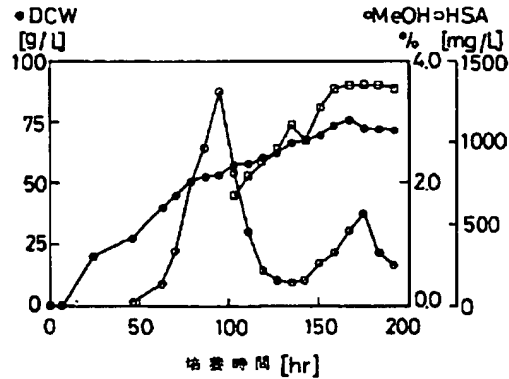
【図4】 FM-21培地を使用したビキア酵母GCP101の他の培養結果を示す。

【図5】 酵母由来成分のEIA法による測定用の標準線を示す。

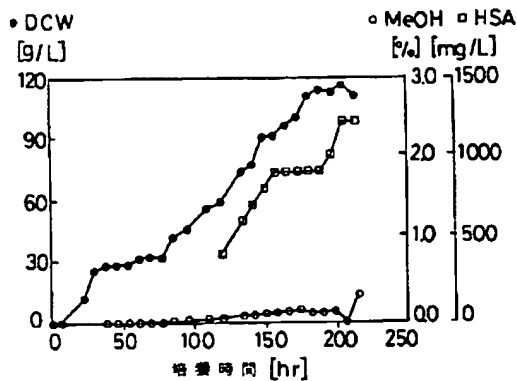
【図1】



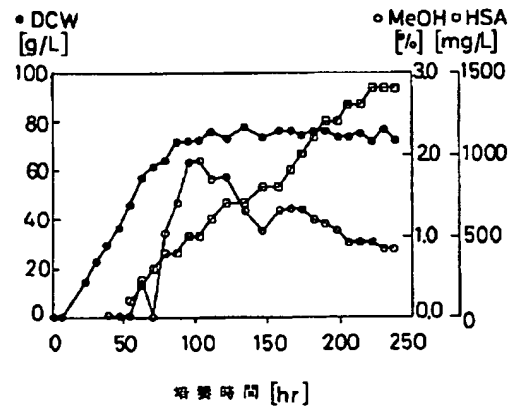
【図2】



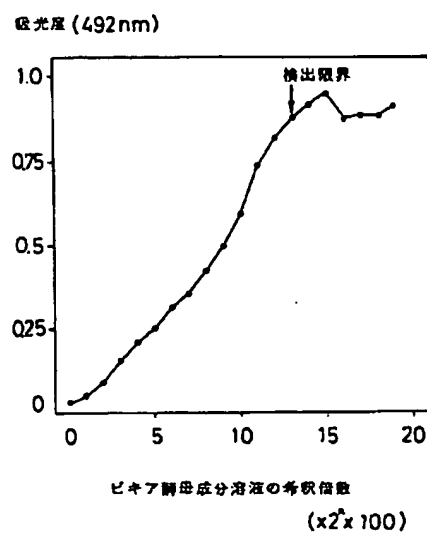
【図3】



【図4】



【図5】




---

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:84)

(72) 発明者 川辺 晴英

大阪府枚方市招提大谷 2 丁目 25 番 1 号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内